

TEAD1在小鼠急性心肌梗死后心肌组织中的表达作用

张 驰¹ 燕 茹² 贾绍斌^{2,3,4}

1. 宁夏医科大学临床医学院 宁夏 银川 750004

2. 宁夏医科大学总医院心脏中心 宁夏 银川 750004

3. 宁夏医科大学 宁夏 银川 750004

4. 宁夏医科大学总医院医学科学研究院 宁夏 银川 750004

摘要:目的: 观察TEA转录因子1 (TEAD1) 在小鼠急性心肌梗死后心肌组织中的表达情况及细胞定位, 进一步探讨TEAD1在急性心肌梗死后作用及相关机制。方法: 将40只6周龄C57BL/6雄性小鼠随机分为急性心肌梗死组 (AMI组) 和假手术组 (Sham组), AMI组通过结扎冠状动脉左前降支近端的方法建立急性心肌梗死模型, 造模成功以观察即刻心电图ST段改变判断, Sham组仅用6-0手术线穿过冠状动脉左前降支近端但不结扎。两组分别于术后1、3、7、14天取材, 进行HE染色及Masson染色观察急性心肌梗死后心肌组织的病理改变。免疫组化检测转录因子TEAD1和巨噬细胞标志物CD68在急性心肌梗死后小鼠心肌组织中的表达情况; 免疫荧光双标法观察TEAD1在急性心肌梗死后心肌组织中是否在巨噬细胞中高表达。结果: TEAD1免疫组化结果显示, Sham组和AMI组在不同时间均在心肌细胞核可见TEAD1少量表达; 与同时点Sham组相比, AMI组各时间点TEAD1表达量明显增加 ($P < 0.01$), AMI组各时间点TEAD1表达呈先增后减的变化趋势, 且主要在梗死交界区表达, 其中AMI组第3天时表达量最多, 且AMI组相邻各时间点TEAD1表达量之间有明显统计学差异 ($P < 0.001$); CD68免疫组化结果显示, 与同时点Sham组相比, AMI组各时间点CD68表达量明显增加 ($P < 0.001$), AMI组各时间点CD68表达呈先增后减的变化趋势, 且主要在梗死交界区表达, 其中AMI组第3天时表达量最多, 且AMI组相邻各时间点CD68表达量之间有明显统计学差异 ($P < 0.001$); 免疫荧光双标结果显示TEAD1在AMI组心肌组织中的巨噬细胞中高表达, 除第14天外, 与同时点Sham组相比, 表达TEAD1的巨噬细胞数量在AMI组各时间点明显增加 ($P < 0.05$), 表达TEAD1的巨噬细胞数量在AMI组各时间点呈先增后减的变化趋势, 且主要在梗死交界区表达, 其中AMI组第3天时表达量最多, 且AMI组相邻各时间点表达TEAD1的巨噬细胞数量之间有明显统计学差异 ($P < 0.01$)。结论: 转录因子TEAD1和巨噬细胞标志物CD68在小鼠急性心肌梗死后心肌组织中都呈现表达增加的特点, 在急性心肌梗死后第3天表达量最多, 并且主要在梗死交界区表达; TEAD1除了心肌细胞表达外, 可以定位在急性心肌梗死后梗死交界区的巨噬细胞中。

关键词: TEAD1; 急性心肌梗死; 巨噬细胞; 小鼠

1 资料与方法

1.1 实验材料与仪器

苏木素-伊红染色试剂盒 (赛维尔); Masson三色染色试剂盒 (索莱宝); TEAD1抗体 (艾比玛特); CD68抗体 (赛维尔); 兔二步法检测试剂盒 (中杉金桥); F4/80抗体 (abcam); FITC标记山羊抗大鼠IgG (Jackson ImmunoResearch); Cy3标记山羊抗兔IgG (赛维尔); 光学显微镜 (Olympus); 低温离心机 (Eppendorf); 切片机 (瑞沃德)。

1.2 实验动物

宁夏医科大学实验动物中心购得健康6周龄C57BL/6

雄性小鼠40只, 体重范围为21-23g[SCXK(宁)2020-0001]。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及模型构建

将6周龄雄性C57BL/6小鼠在SPF级实验条件下以普通饲料适应性喂养一周, 以随机数表法随机分为急性心肌梗死手术组 (AMI组) 和假手术组 (Sham组), 术前用异氟烷吸入麻醉小鼠, 待小鼠完全麻醉后, 接入动物心电图记录仪, 观察小鼠心电图正常后开始手术。AMI组入胸后于左心耳下缘以6-0号线迅速穿过并结扎左前降支近端, 当左心室前壁心肌部分颜色转为苍白, 并且心电图ST段明显抬高说明小鼠急性心梗模型造模成功。Sham组在手术过程中仅用6-0号线穿过左前降支近端但不进行结扎。手术后待小鼠自主呼吸恢复后, 将其从手术台移至保温垫上观察半小时以上并记录手术过程, 术后每天观

作者简介: 张驰 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 冠心病的发病机制。

通信作者: 贾绍斌, 教授, E-mail: jsbxn@163.com

察并记录小鼠的一般情况，并在术后第1、3、7、14天处死小鼠并留取心脏标本。

1.3.2 心电图监测

小鼠完全麻醉后，将动物心电图记录仪的黑色、红色、白色电极针分别插入C57BL/6小鼠右后肢、左后肢及右前肢皮下并固定，分别于手术前后观察小鼠心电图的改变。

1.3.3 苏木精-伊红 (HE) 染色

制备好的石蜡切片经烤片、脱蜡、水化后，苏木素浸染5min，水洗片刻后，1%的盐酸乙醇分化两下，冲水反蓝3min，伊红浸染5min后经95%的酒精、无水乙醇脱水片刻，然后环保透明液透明2次，每次3min，用中性树胶封片，光学显微镜下观察心肌组织病理改变。

1.3.4 Masson染色

制备好的石蜡切片经烤片、脱蜡、水化后，苏木素浸染5min，水洗片刻后，1%的盐酸乙醇分化两下，冲水反蓝3min，丽春红品红溶液染8min，0.2%冰醋酸冲洗1min，磷钼酸溶液浸染1min，苯胺蓝浸染1min，0.2%冰醋酸冲洗1min，脱水、透明后，用中性树胶封片，在光学显微镜下观察心肌组织纤维化情况，其中正常心肌组织呈红色，胶原纤维呈蓝色。

1.3.5 免疫组化

将石蜡切片常规脱蜡至水，3%过氧化氢孵育15min，蒸馏水洗3次，每次3min，加入抗原修复液在高压锅中95℃保持15min进行抗原修复，冷却至室温后PBS冲洗，10%山羊血清封闭，加入一抗TEAD1 (1:200)于4℃冰箱过夜，次日PBS冲洗后孵育二抗，DAB显色，苏木素染核，脱水透明后中性树胶封片，光学显微镜下观察表达情况，正常细胞核呈蓝色，蛋白阳性表达区域呈棕黄色，经Image J软件测定阳性面积并进行统计学分析。

1.3.6 免疫荧光染色

将冰冻切片于4%多聚甲醛中固定10min，蒸馏水洗5min，3%过氧化氢孵育15min，蒸馏水洗3次，每次3min，加入抗原修复液在高压锅中95℃保持15min进行抗原修复，冷却至室温后PBS冲洗，0.5%TritonX-100室温孵育30min，PBS冲洗，10%山羊血清封闭30min，加入一抗TEAD1 (1:100)和F4/80 (1:50)于4℃冰箱过夜，次日PBS冲洗后在黑暗环境下孵育荧光二抗，PBS冲洗后，用含DAPI的荧光封片剂封片，荧光显微镜下进行观察并采集图片。

1.4 统计学方法

数据均采用GraphPad prism 8.0软件进行分析。计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因

素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠急性心肌梗死模型鉴定

Sham组心电图相比手术之前无明显改变，而AMI组术后心电图即刻出现了ST段抬高的改变，这说明急性心肌梗死模型造模成功，见图1。

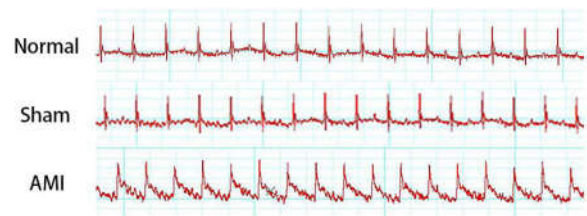


图1 心电图显示急性心肌梗死模型造模成功

3 讨论

急性心肌梗死作为临床危害极大的急危重症，有着高发病率和高死亡率^[11]。成年哺乳动物急性心肌梗死后心肌组织因缺血缺氧而导致心肌细胞以坏死、凋亡等方式大量丢失，丢失的心肌细胞因自我再生能力极其有限，随着炎症反应不同阶段，常由心肌成纤维细胞、巨噬细胞等经历不同表型变化并参与纤维性修复而形成疤痕组织，但疤痕组织的形成并不能代替心肌细胞的收缩功能，反而极大的限制了心脏的顺应性并使心脏重构，最终导致急性或慢性心力衰竭、心律失常、猝死等严重后果^[11,12,13]。所以若能找到靶点可以实现心肌细胞的有效再生或改善心脏重构，将降低急性心肌梗死后心功能恶化的风险，从而改善急性心肌梗死患者的预后。

既往的研究已经证明了在心肌细胞中Hippo信号通路及其效应器YAP/TAZ在急性心肌梗死后心脏再生及修复中的潜在作用^[2,14,15]。TEAD1作为Hippo信号通路下游重要的转录共激活因子，本研究通过免疫组化染色发现了TEAD1在心肌细胞核中的少量表达，有研究表明TEAD1在心肌细胞内除了被发现在小鼠胚胎心脏发育和成人心脏稳态的维持方面的重要作用外，Liu等人的研究表明TEAD1对围产期心肌细胞增殖至关重要，TEAD1的缺失会使心肌细胞不能进入细胞周期进行增殖最终导致出生后死亡。对Hippo信号通路效应器YAP的研究显示其调节心肌细胞增殖是依赖和YAP/TEAD1相互作用的，抑制YAP/TEAD1相互作用则会使出生后早期心肌细胞增殖能力下降。这些研究都表明了TEAD1在心肌细胞中具有调节心肌细胞增殖的能力，但是关于TEAD1在成年小鼠心肌细胞中是否具有独立或依赖YAP参与调节心肌细胞增殖从而实现急性心肌梗死后心脏再生的能力还需要通过基因工程技术进一步研究。

通过调节急性心肌梗死后巨噬细胞的从促炎表型向修复表型转换已经在多个研究表明可以通过改善纤维炎症反应所造成的心脏重构而改善急性心肌梗死预后^[16-18]，Mia等人发现^[10]Hippo信号通路效应因子YAP/TAZ可以作为调节急性心肌梗死后巨噬细胞表型转换和改善急性心肌梗死后心脏修复的靶点，YAP/TAZ在促炎巨噬细胞中表达量会明显增加，而YAP/TAZ在急性心肌梗死后巨噬细胞中表达的缺陷会导致巨噬细胞从促炎表型向修复表型转换，从而使急性心肌梗死后心肌纤维化及心肌肥大减轻，组织血管生成和心功能改善。本研究最重要的是首次在急性心肌梗死后巨噬细胞中发现了TEAD1的高表达，并且发现急性心肌梗死后第3天时TEAD1的表达量、巨噬细胞的数量及表达TEAD1的巨噬细胞都最多，从急性心肌梗死后炎症反应角度来看，此时属于炎症反应期，以促炎巨噬细胞为主，这表明TEAD1和YAP/TAZ一样也在促炎巨噬细胞表达明显增加，但TEAD1作为YAP/TAZ下游转录共激活因子是否具有类似YAP/TAZ的调节巨噬细胞表型及改善急性心肌梗死后心脏修复的作用还需要进一步探究。其次研究表明巨噬细胞在心脏再生模型和成年哺乳动物心脏中急性心肌梗死后表现为完全不同的修复模式。在新生小鼠、斑马鱼等心脏再生模型心脏中特殊表型的巨噬细胞除了协同心肌成纤维细胞调节纤维瘢痕组织的及时消退外^[19,20]，具有直接支持心脏再生的能力^[3,21]，在此心脏再生模型中巨噬细胞的耗竭常常导致心脏再生能力的丧失及纤维化瘢痕的形成^[22,23]。而相比于心脏再生模型在成年哺乳动物急性心肌梗死后巨噬细胞可以单独或通过激活心肌成纤维细胞来调节纤维炎症反应及疤痕组织的形成并在急性心肌梗死后心脏重塑及心力衰竭的发生发展中起重要作用^[24]，总之基于巨噬细胞探究急性心肌梗死后心脏再生及纤维性修复的机制是很有意义的，但关于TEAD1在急性心肌梗死后心脏巨噬细胞中还有没有支持心脏再生的机制还需要进一步探究。此外关于我们发现表达TEAD1的巨噬细胞主要在急性心肌梗死后心肌组织中的梗死交界区表达，有研究显示梗死交界区是急性心肌梗死后沿着被堵塞血管的供血轴依据缺血状态所划分的缺血可逆区域^[25]，在此区域的及时干预会有效减少心肌细胞丢失^[26]，因此若我们在梗死交界区找到实现心脏再生及改善心脏重构的靶点是很有实际意义和必要的。

综上所述，本研究观察TEAD1在急性心肌梗死小鼠心肌组织的具体表达情况，发现TEAD1在急性心肌梗死后心肌组织中14天内具有表达增加的特点，且在心肌梗死后3天表达量最多，并且主要在梗死交界区表达，除

了验证TEAD1在心肌细胞核中表达外，首次发现TEAD1在急性心肌梗死后炎症修复反应浸润的巨噬细胞中高表达，这为我们后续研究TEAD1在急性心肌梗死后所起的作用和TEAD1在急性心肌梗死后心脏巨噬细胞中发挥的作用及机制提供了基础，为找到能改善急性心肌梗死后再生及修复的靶点提供新的思路。

参考文献

- [1] Venugopal H, Hanna A, Humeres C, et al. Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction[J]. *Cells*, 2022, 11(9):1386.
- [2] Xin M, Kim Y, Sutherland L B, et al. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(34):13839-13844.
- [3] Li Y, Feng J, Song S, et al. gp130 Controls Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration[J]. *Circulation*, 2020, 142(10):967-982.
- [4] Stewart A F, Larkin S B, Farrance I K, et al. Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain[J]. *The Journal of biological chemistry*, 1994, 269(5):3147-3150.
- [5] Li Z, Zhao B, Wang P, et al. Structural insights into the YAP and TEAD complex[J]. *Genes & development*, 2010, 24(3):235-240.
- [6] Liu R, Lee J, Kim B S, et al. Tead1 is required for maintaining adult cardiomyocyte function, and its loss results in lethal dilated cardiomyopathy[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(17):93343.
- [7] Chen Z, Friedrich G A, Soriano P. Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice[J]. *Genes & development*, 1994, 8(19):2293-2301.
- [8] Tsika R W, Ma L, Kehat I, et al. TEAD-1 overexpression in the mouse heart promotes an age-dependent heart dysfunction[J]. *The Journal of biological chemistry*, 2010, 285(18):13721-13735.
- [9] Liu R, Jagannathan R, Li F, et al. Tead1 is required for perinatal cardiomyocyte proliferation[J]. *PLoS One*, 2019, 14(2):e0212017.
- [10] Mia M M, Cibi D M, Abdul Ghani S A B, et al. YAP/TAZ deficiency reprograms macrophage phenotype and improves infarct healing and cardiac function after myocardial infarction[J]. *PLoS biology*, 2020, 18(12):e3000941.

- [11] 马丽媛,王增武,樊静,et al.《中国心血管健康与疾病报告2022》要点解读[J].中国全科医学,2023,26(32):3975-3994.
- [12] Aronow W S. Heart-Failure-Complicating Acute Myocardial Infarction[J]. Clinics in Geriatric Medicine, 2007, 23(1):123-139.
- [13] Jennifer F, R O A, P Z E. Arrhythmias After Acute Myocardial Infarction[J]. The Yale journal of biology and medicine, 2023, 96(1):83-94.
- [14] Heallen T, Morikawa Y, Leach J, et al. Hippo signaling impedes adult heart regeneration[J]. Development (Cambridge, England), 2013, 140(23):4683-4690.
- [15] Leach J P, Heallen T, Zhang M, et al. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction[J]. Nature, 2017, 550(7675):260-264.
- [16] Wang F, Li M, Zhang A, et al. PCSK9 Modulates Macrophage Polarization-Mediated Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction[J]. Journal of Immunology Research, 2022, 2022:7685796.
- [17] Jung M, Ma Y, Iyer R P, et al. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation[J]. Basic Research in Cardiology, 2017, 112(3).
- [18] Ning Y, Huang P, Chen G, et al. Atorvastatin-pretreated mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote cardiac repair after myocardial infarction via shifting macrophage polarization by targeting microRNA-139-3p/Stat1 pathway[J]. BMC Medicine, 2023, 21(1).
- [19] Simoes F C, Cahill T J, Kenyon A, et al. Macrophages directly contribute collagen to scar formation during zebrafish heart regeneration and mouse heart repair[J]. Nature Communications, 2020, 11(1):600.
- [20] Bevan L, Lim Z W, Venkatesh B, et al. Specific macrophage populations promote both cardiac scar deposition and subsequent resolution in adult zebrafish[J]. Cardiovascular research, 2020, 116(7):1357-1371.
- [21] Bruton F A, Kaveh A, Ross-Stewart K M, et al. Macrophages trigger cardiomyocyte proliferation by increasing epicardial vegfaa expression during larval zebrafish heart regeneration[J]. Developmental Cell, 2022, 57(12):1512-1528 e1515.
- [22] Aurora A B, Porrello E R, Tan W, et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration[J]. The Journal of clinical investigation, 2014, 124(3):1382-1392.
- [23] Godwin J W, Debuque R, Salimova E, et al. Heart regeneration in the salamander relies on macrophage-mediated control of fibroblast activation and the extracellular landscape[J]. NPJ Regenerative medicine, 2017, 2(1):145-147.
- [24] Hulsmans M, Sager H B, Roh J D, et al. Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction[J]. The Journal of experimental medicine, 2018, 215(2):423-440.
- [25] Jackson B M, Gorman J H, Moainie S L, et al. Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 40(6):1160-1167.
- [26] Jin P, Wang E, Wang Y H, et al. Central zone of myocardial infarction: a neglected target area for heart cell therapy[J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2012, 16(3):637-648.